

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Masaru Furuta, et al.

Application No.: NEW APPLICATION

Confirmation No.: N/A

Filed: November 4, 2003

Art Unit: N/A

For: METHOD FOR PREPARING A SAMPLE FOR USE IN  
LASER DESORPTION IONIZATION MASS  
SPECTROMETRY AND SAMPLE PLATE USED IN  
SUCH A METHOD

Examiner: Not Yet Assigned

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

MS Patent Application  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-326665	November 11, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith. Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 18-0013, under Order No. NOG-0019 from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: November 4, 2003

Respectfully submitted,

By 

David T. Nikaido

Registration No.: 22,663

Carl Schaukowitch

Registration No.: 29,211

RADER, FISHMAN &amp; GRAUER PLLC

1233 20th Street, N.W., Suite 501

Washington, DC 20036

(202) 955-3750

Attorney for Applicant

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                    2 0 0 2 年 1 1 月 1 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号                    特 願 2 0 0 2 - 3 2 6 6 6 5  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                    [ J P 2 0 0 2 - 3 2 6 6 6 5 ]

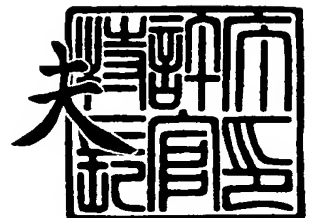
出      願      人                    株式会社島津製作所  
Applicant(s):



2 0 0 3 年    8 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 9 8 3 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020387

【提出日】 平成14年11月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 35/00

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津  
                            製作所内

    【氏名】 古田 大

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津  
                            製作所内

    【氏名】 花房 信博

【特許出願人】

    【識別番号】 000001993

    【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

    【識別番号】 100085464

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 037017

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザー脱離イオン化質量分析における試料作成方法とそれに用いるサンプルプレート

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 質量分析装置に装着されたサンプルプレート上に配置された試料にレーザー光を照射することにより試料をイオン化して分析するレーザー脱離イオン化質量分析方法のサンプルプレート上に分析対象の試料を作成する方法において、

前記サンプルプレート表面の一部の領域をレーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域とし、サンプルプレート表面の他の領域を、試料が固相化されたメンブレンを固定する平面領域とし、

試料が固相化されたメンブレンが前記平面領域に固定された状態にした後、前記メンブレンから試料を抽出し、その抽出した試料を前記イオン化領域に配置してイオン化用の試料を作成することを特徴とする試料作成方法。

【請求項 2】 試料のイオン化は、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化方法であり、前記イオン化領域に配置する試料はマトリックスを用いて作成する請求項 1 に記載の試料作成方法。

【請求項 3】 試料が固相化されたメンブレンが前記平面領域に固定された状態にする方法として、

試料が展開された媒体をメンブレンに重ねて配置し、前記媒体とメンブレン間に電圧を印加することにより試料を前記媒体からメンブレンに転写した後、前記メンブレンを前記サンプルプレートと電氣的に導通した状態に固定する方法により行う請求項 1 又は 2 に記載の試料作成方法。

【請求項 4】 分析対象の試料を表面上に配置し、質量分析装置に装着されて試料にレーザー光が照射されることにより試料がイオン化されて分析されるレーザー脱離イオン化質量分析装置で用いられるサンプルプレートにおいて、

その表面にレーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域と、試料が固相化されたメンブレンが固定される平面領域とを備えたことを特徴とするサンプルプレート。

【請求項5】 前記イオン化領域は、各試料が配置される部分が他の部分と境界により区分されて試料を局在化して配置しうるようになっている請求項4に記載のサンプルプレート。

【請求項6】 前記境界には試料配置部分を取り囲む溝が形成されている請求項5に記載のサンプルプレート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床、診断、生化学、分子生物学などの分野において、メンブレン上に展開して固相化された物質を質量分析する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

対象分子の質量を分析する目的で、質量分析装置に装着されたサンプルプレート上に配置された試料にレーザー光を照射することにより試料をイオン化して分析するレーザー脱離イオン化質量分析方法が行なわれている。試料をサンプルプレート上に配置して作成する際、マトリックスを使用する方法と、使用しない方法がある。

【0003】

マトリックスを使用する方法を飛行時間型質量分析装置と組み合わせた方法は、MALDI-TOF（マトリックス支援型レーザー脱離イオン化-飛行時間）質量分析方法と呼ばれている。MALDI-TOFでは、測定試料はマトリックス溶液とともに金属製サンプルプレートに滴下し、乾燥後測定を行っている。この際滴下される試料は一定領域に密に結晶化することが要求される。

【0004】

一方、対象試料としては、生体分子を電気泳動等により分離した後、メンブレンに転写して固相化し、そのメンブレンに固相化された試料に対しピエゾ素子による微量分注技術を利用してメンブレン上で各種反応を行い生成する反応産物を利用して質量分析する方法が提唱されている（特許文献1参照。）。

【0005】

**【特許文献1】**

国際公開第WO98/47006号パンフレット

**【特許文献2】**

特開平10-40858号公報

**【非特許文献1】**

「分析」No.4、pp.253～261（1996年）

**【0006】****【発明が解決しようとする課題】**

メンブレンに固相化された試料の質量分析を行なう場合、当該反応産物は直接メンブレン上でMALDI-TOF測定を行うよりも、メンブレンから抽出した後MALDI用サンプルプレートに移し替えて測定する方がより高精度な測定が可能になる。

**【0007】**

そこで、メンブレンから試料を抽出し、サンプルプレートに移し替えてMALDI-TOF用サンプルプレートを作製する手順を装置化しようとした場合、2枚のプレート（ステージ）が必要になる。すなわち分離した生体試料を保持するメンブレンを固定し、対象分子固相化位置を認識して試薬分注を行うためのステージと、メンブレンから抽出した試料を配置してMALDI-TOF質量分析装置に導入するためのサンプルプレートである。これらを同一の装置で制御しようとするれば、2数のプレート又はステージを同一面上に並列に配置することになるため、装置を小型化する際に制約を受けることになる。

**【0008】**

ここでは、MALDI-TOF測定用に試料を調製する場合を説明したが、マトリックスを用いなくて試料を調製する場合も同様の問題がある。

本発明は、マトリックスを用いる場合も用いない場合も含めて、メンブレンに固相化された試料をレーザー脱離イオン化質量分析方法のサンプルプレートに移し替える作業を小型の装置で実現できるようにすることを目的とするものである。

**【0009】**

**【課題を解決するための手段】**

上記目的を達成するために、本発明では、1枚のサンプルプレートに、質量分析用の試料を配置する領域に加えて試料固相化メンブレンを固定する領域を設定する。

すなわち、本発明の試料作成方法は、質量分析装置に装着されたサンプルプレート上に配置された試料にレーザー光を照射することにより試料をイオン化して分析するレーザー脱離イオン化質量分析方法のサンプルプレート上に分析対象の試料を作成する方法であって、サンプルプレート表面の一部の領域をレーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域とし、サンプルプレート表面の他の領域を、試料が固相化されたメンブレンを固定する平面領域とし、試料が固相化されたメンブレンが前記平面領域に固定された状態にした後、メンブレンから試料を抽出し、その抽出した試料を前記イオン化領域に配置してイオン化用の試料を作成することを特徴とする試料作成方法である。

**【0 0 1 0】**

また、本発明のサンプルプレートは、分析対象の試料を表面上に配置し、質量分析装置に装着されて試料にレーザー光が照射されることにより試料がイオン化されて分析されるレーザー脱離イオン化質量分析装置で用いられるサンプルプレートであり、その表面にレーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域と、試料が固相化されたメンブレンが固定される平面領域とを備えたことを特徴とするものである。

**【0 0 1 1】**

このように、試料イオン化のためのイオン化領域と、試料が固相化されたメンブレンが固定される平面領域とが同一プレートに設けられることで、装置内で使用するステージの面積の縮小が可能になり、これにより装置全体の小型化がはかれる。

**【0 0 1 2】**

試料のイオン化の好ましい一方法は、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化方法である。その場合、サンプルプレートのイオン化領域に配置する試料はマトリックスを用いて作成する。

**【0013】**

試料が固相化されたメンブレンがサンプルプレートの平面領域に固定された状態にする方法の一例は、試料が展開された媒体をメンブレンに重ねて配置し、その媒体とメンブレン間に電圧を印加することにより試料を媒体からメンブレンに転写した後、そのメンブレンをサンプルプレートと電氣的に導通した状態に固定する方法により行うものである。

**【0014】**

好ましい形態では、サンプルプレートのイオン化領域は、各試料が配置される部分が他の部分と境界により区分されて試料を局在化して配置しうるようになっている。その境界には、一例として、試料配置部分を取り囲む溝が形成されている。

**【0015】**

メンブレンに固相化される試料の例は、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）ポリアクリルアミド電気泳動、又は等電点電気泳動及びSDSポリアクリルアミド電気泳動の組合わせによる二次元電気泳動、又はその他のクロマトグラフィーによって分離されたタンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸等の分子又はそれらの混合物である。

**【0016】**

これらの試料は、タンパク質分解酵素、糖分解酵素、ヌクレアーゼ又はそれらの組合わせ等により修飾を受けることができる。そして、このように修飾を受けた試料は、溶媒によりメンブレンから抽出することができるようになる。抽出した試料をサンプルプレートのイオン化領域に滴下して配置する。

**【0017】**

固相化に使用されるメンブレンの材質としては、PVDF（polyvinylidene difluoride）、ニトロセルロース、ナイロン（登録商標）又はその派生物等を挙げることができる。

**【0018】****【発明の実施の形態】**

図1に一実施例のサンプルプレート2を示す。（A）は平面図、（B）はその



図で横方向に切断した状態での断面図を部分的に拡大して示す図である。

サンプルプレート 2 はステンレス製の金属プレートにてなり、レーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域である質量分析用測定試料作成領域 4 4 と、試料が固相化されたメンブレンを固定する平面領域であるメンブレン貼付け領域 4 6 を併せもっている。

#### 【 0 0 1 9 】

このうち、測定試料作成領域 4 4 は、メンブレン貼付け領域 4 6 に貼り付けられて固定されたメンブレンから抽出された試料がマトリックス溶液とともに滴下されて配置されるスポット 4 8 が規則的に配列されている。スポット 4 8 は (B) に拡大した断面図が示されているように、一定領域から拡散せず収束したまま乾燥するように、周囲が溝 5 0 で取り囲まれた円形の構造をしている。

#### 【 0 0 2 0 】

メンブレン貼付け領域 4 6 は全面にわたってメンブレンが金属プレートに密着する必要があるため、完全な平面をなしている。メンブレンはこの領域に導電性両面テープ等を利用して固定される。

#### 【 0 0 2 1 】

メンブレン貼付け領域 4 6 は単なる平板でもよいが、図のような枠を凹凸や塗料により形成しておけば、その枠をメンブレン固定用のガイドラインとして利用することができるようになり、メンブレン固定作業の作業性が向上する。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明のサンプルプレートを用いて作製した試料は、レーザー脱離イオン化質量分析装置で分析される。レーザー脱離イオン化質量分析装置は、サンプルのみ又はサンプルとマトリックスとの混合物が分析対象物として設置されるイオン化室、その分析対象物にレーザー光を照射してサンプルをイオン化するレーザー照射光学系、及びイオン化されたサンプルイオンを引き出し質量数に応じて分離検出する質量分析部を備えている。レーザー脱離イオン化質量分析装置では、分析対象物に窒素ガスレーザー（波長 3 3 7 n m）、N d - Y A G レーザー（波長 2 6 6 n m 又は 3 5 5 n m）、炭酸ガスレーザー（波長 1 0 6 0 n m、2 . 9 4  $\mu$  m）などのレーザー光を照射してサンプルをイオン化し、そのイオン化されたサ

ンプルを質量分析部に導いて分析する。この分析方法は、レーザー光を光学レンズにより直径数 $\mu$ mまで集光できることから、微小部分の分析が可能なものとして注目されている。

#### 【0 0 2 3】

分析対象物がサンプルのみの場合は、サンプル自身がレーザー光を吸収することによりレーザー光から直接エネルギーを得てイオン化する。一方、マトリックスを用いる場合は、マトリックスがレーザー光を吸収して熱エネルギーに変換し、マトリックスの一部が急速に加熱されてサンプルとともに気化する。この場合サンプル分子が中性のままで脱離しても、同時に帰化されたプロトンや陽イオン（不純物として存在）、又はマトリックスイオンがサンプル分子に付加すればサンプルイオンとなる。レーザー光は1ナノ秒程度のパルスレーザー光として照射するのが好ましい。

#### 【0 0 2 4】

マトリックスを用いる場合のサンプル調製は、サンプル溶液とマトリックス溶液をモル比で1：100～1：10000で混合した後、乾燥させ、両者がミクロンレベルで均一に混合された状態を作る。その結果、サンプルの微細な結晶を多量のマトリックス結晶が取り囲んだ結晶状態又はアモルファス状態となっている。一般にはこの分析対象物には不純物として、又は予め添加された陽イオンや陰イオンが含まれている。

#### 【0 0 2 5】

マトリックスとしては、分析対象物の種類に応じて種々のものが使用されており、例えばニコチン酸、2-ピラジンカルボン酸、シナピン酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、5-メトキシサリチル酸、 $\alpha$ -シアノー4-ヒドロキシケイ皮酸、3-ヒドロキシピコリン酸、ジアミノナフタレン、2-(4-ヒドロキシフェニラゾ)安息香酸、ジスラノール、コハク酸、5-(トリフルオロメチル)ウラシル、グリセリンなどを使用することができる（非特許文献1参照。）。

#### 【0 0 2 6】

レーザー脱離イオン化質量分析に用いられる質量分析部としては、飛行時間型質量分析装置（TOFMS）が用いられるが、フーリエ変換型イオンサイクルト

ロン共鳴質量分析計（F T M S）、磁場と電場を用いてイオンを選別して検出器に導く二重収束型質量分析計（ダブルフォーカス M S）、三次元四重極型イオントラップ質量分析計等も使用することができる。

#### 【 0 0 2 7 】

レーザー脱離イオン化を飛行時間型質量分析装置と組み合わせれば分子量では免疫グロブリン M（平均分子量 9 0 0 k D a）まで検出でき、検出限界も a m o l レベルに達していると言われている。また、イオン化が可能な化合物はペプチド、タンパク質、多糖類、複合脂質、核酸関連物質等の生体関連物質一般、合成ポリマー、オリゴマー、金属配位化合物や無機化合物まで広範囲に及んでいる。

#### 【 0 0 2 8 】

図 2 に M A L D I - T O F 質量分析装置の一例を示す。

イオン化室にはサンプルプレート 2 に乗せられた分析対象物 4 が設置されている。分析対象物 4 はこの場合、試料とマトリックスとの混合物とする。試料をイオン化するための窒素レーザー（波長 3 3 7 n m）6 からのレーザービームを分析対象物 4 に集光して照射するために、ミラー 8、そのミラー 8 で折り曲げられたレーザー光を集光する光学レンズ 1 0 及びレーザー光の不要な高調波等を除去するための光学フィルター 1 1 が配置されている。

#### 【 0 0 2 9 】

イオン化された試料イオンを分析するための質量分析部として、飛行時間型質量分析計が設けられている。その質量分析計は、分析対象物 4 に接近してイオンを引き出すためのイオンレンズ 2 2、そのイオンレンズ 2 2 で引き出されたイオンを検出器の方向に導いたり、検出器の方向から外れた方向に導くための偏向板 2 4、その偏向板 2 4 を通過したイオンが入射して検出される検出器 2 6 を備えている。

#### 【 0 0 3 0 】

検出器 2 6 からのイオン検出信号は A D 変換器 3 2 に導かれる。飛行時間型質量分析装置では飛行時間を測定するための時間の原点（ゼロ点）を定めるために、窒素レーザー 6 にはフォトダイオード 3 4 が設けられ、そのフォトダイオード 3 4 の検出信号がスタート信号として A D 変換器 3 2 に導かれる。A D 変換器 3

2ではスタート信号を時間の原点として検出器26の信号をデジタル信号に変換する。36はAD変換器32でデジタル信号に変換された検出器信号を入力してデータ処理をしたり、この分析装置全体の動作を制御するホストコンピューターである。

#### 【0031】

次に、このMALDI-TOF質量分析装置の動作について説明する。

レーザー光はフィルター11で調光され、レンズ10で集光されて分析対象物4に照射され、イオン化が行なわれる。発生したサンプルイオンはサンプルプレート2に印加された電圧 $V_0$ とイオンレンズ22の分析対象物側のグランド電位とによって引き出され、その引き出されたイオンは次段のイオンレンズに印加された電圧 $V_L$ によって平行飛行をする。偏向板24の電位 $V_D$ がグランド電位であるときは、イオンが直線飛行して検出器26に到達し検出される。

#### 【0032】

偏向板24に電位 $V_D$ を印加すれば、イオンは曲げられて検出器26には到達しなくなる。

イオンは検出器26で検出されて増幅された後、レーザー発振時点を飛行時間の原点としてAD変換器32によってデジタル信号に変換され、ホストコンピューター36に導かれて分析がなされる。

レーザー6は分析部20の真空系の外部に設置し、真空系の光導入窓を通して導入する。

#### 【0033】

##### 【発明の効果】

本発明では、メンブレン固定用プレートとマス測定用プレートを別々に用意する必要がなくなるため、解析にかかるコストを低減することができ、また装置内で各プレートが占有する面積を削減できるため装置の小型化を可能にする。

また、当然単純な一般の質量分析サンプルプレートとして使用することも可能であるし、あるいはメンブレン上に固相化したままの試料を直接質量分析する手法にも応用できるため、1枚のプレートで多種類の解析への適用法を提供するものである。

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

一実施例のサンプルプレート 2 を示す。(A) は平面図、(B) はその図で横方向に切断した状態での断面図を部分的に拡大して示す図である。

**【図 2】**

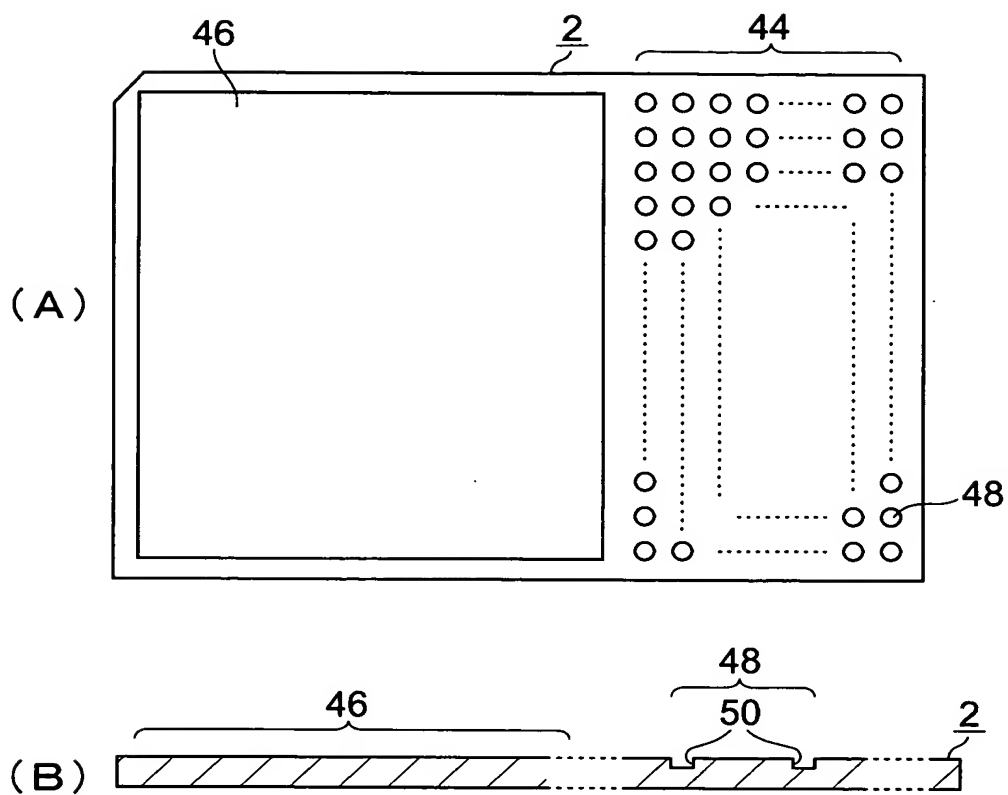
MALDI-TOF 質量分析装置の一例を示す概略構成図である。

**【符号の説明】**

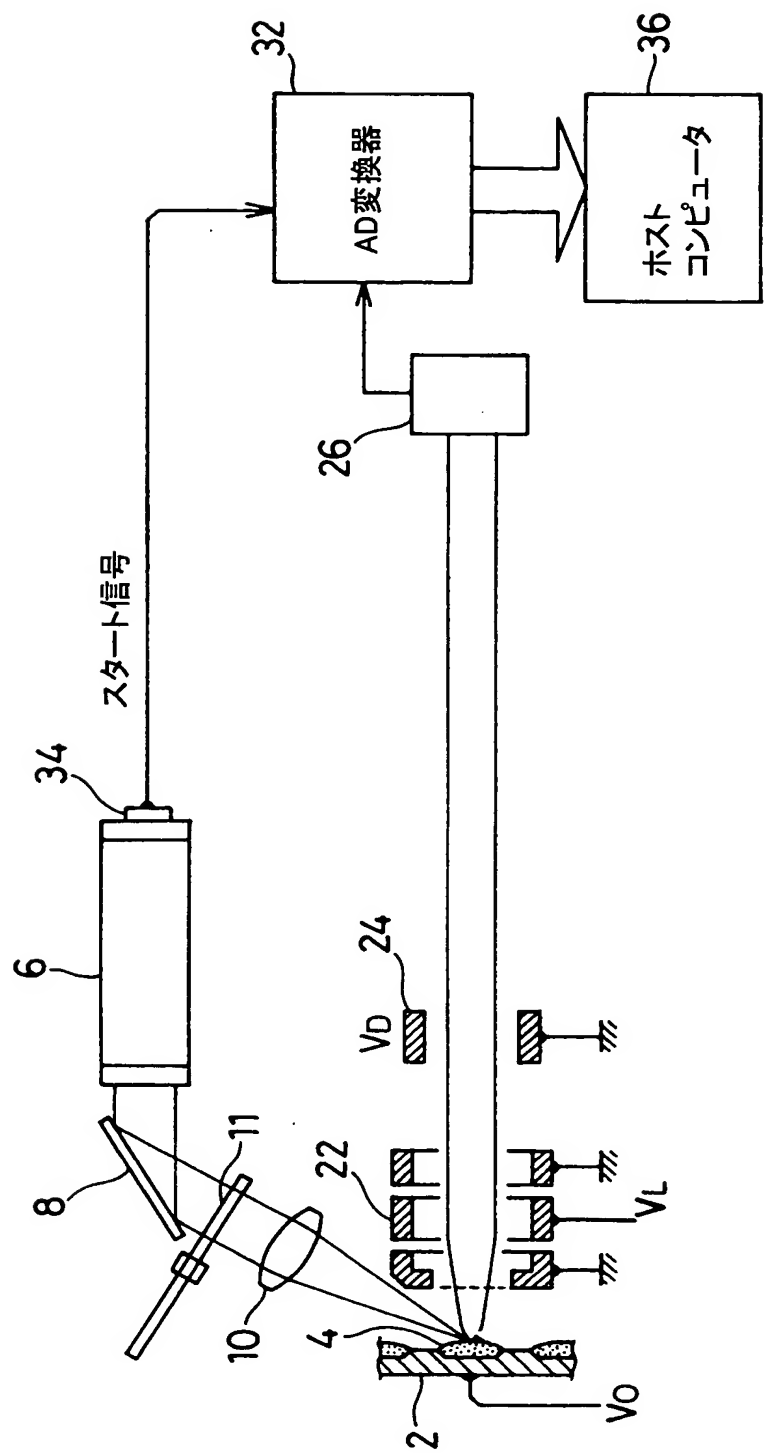
- 2          サンプルプレート
- 4 4        イオン化領域である質量分析用測定試料作成領域
- 4 6        平面領域であるメンブレン貼付け領域

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メンブレンに固相化された試料をレーザー脱離イオン化質量分析方法のサンプルプレートに移し替える作業を小型の装置で実現できるようにする。

【解決手段】 サンプルプレート 2 は、レーザー照射による試料イオン化のためのイオン化領域である質量分析用測定試料作成領域 4 4 と、試料が固相化されたメンブレンを固定する平面領域であるメンブレン貼付け領域 4 6 を併せもっている。測定試料作成領域 4 4 は、メンブレン貼付け領域 4 6 に貼り付けられて固定された滴下されたメンブレンから抽出された試料がマトリックス溶液とともに滴下されて配置されるスポット 4 8 が規則的に配列されている。スポット 4 8 は、一定領域から拡散せず収束したまま乾燥するように、周囲が溝 5 0 で取り囲まれた円形の構造をしている。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 2 - 3 2 6 6 6 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 9 3 ]

1. 変更年月日            1 9 9 0 年    8 月 2 7 日  
    [変更理由]            新規登録  
          住    所        京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地  
          氏    名        株式会社島津製作所
  
2. 変更年月日            2 0 0 3 年    5 月 1 6 日  
    [変更理由]            名称変更  
                            住所変更  
          住    所        京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地  
          氏    名        株式会社島津製作所